

网络出版时间: 2019-5-9 10:21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.031.html>

结直肠癌中 RAC3 表达水平及其对 FOLFOX 方案疗效的影响

方昌义¹, 詹建宝², 苗 祥², 邹兵兵¹, 姜朋朋¹, 余昌俊¹

摘要 目的 探讨受体相关共激酶 3(RAC3)在结直肠癌(CRC)组织中的表达水平及CRC患者对亚叶酸钙联合氟尿嘧啶、奥沙利铂(FOLFOX)方案敏感性的影响。方法 采用荧光实时定量PCR(qRT-PCR)检测48对CRC临床组织标本中RAC3的表达水平,采用 χ^2 检验分析其表达水平与临床病理特征之间的关系。运用免疫组化法检测125例初次评估无法手术切除且术前新辅助化疗(FOLFOX方案)2~3个月的CRC患者的RAC3蛋白表达水平,获检组织标本由结/直肠镜活检获得,并为病理证实为CRC。回顾性分析RAC3表达水平与CRC患者对FOLFOX方案治疗反应的相关性。结果 qRT-PCR显示CRC组织中RAC3水平明显高于癌旁正常黏膜上皮组织($P < 0.01$);其表达水平与肿瘤较晚分期($P = 0.041$)、微血管侵犯($P = 0.014$)、淋巴结转移($P = 0.030$)相关。Kaplan-Meier生存分析显示RAC3表达增高的CRC患者术后总体生存期(OS)缩短。免疫组化显示RAC3蛋白的阳性表达率显著高于正常黏膜上皮组织,且RAC3蛋白阳性表达的CRC患者对FOLFOX方案敏感性低于RAC3蛋白阴性表达者($P < 0.05$)。结论 RAC3在CRC组织中表达明显升高,并与CRC患者对FOLFOX化疗方案的临床反应有关,可能是CRC精准治疗策略中一个潜在的生物标志物。

关键词 受体相关共激酶3;结直肠癌;化疗敏感性

中图分类号 R 735.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0805-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.031

近年来,我国结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的发病率逐年升高,且呈现趋向年轻化的态势。其中,在城市地区恶性肿瘤的发病率位列第二,在农村地区位列第五,年死亡率为10.25/10万人^[1],发病及死亡绝对例数均高居世界第一。目前CRC的外科治疗理念和手段包括:开腹、腹腔镜、机器人D3

CRC根治术,全直肠系膜切除术、结肠完整系膜切除术等均较为成熟并广泛开展,但事实证明,单纯依靠提高手术技术手段并不能明显改善CRC患者的预后。以5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)为基础药物联合奥沙利铂(oxaliplatin, L-OHP)的药物化疗已成为Ⅲ期及部分Ⅱ期CRC患者的标准治疗方案^[2-3],但部分患者对亚叶酸钙联合5-FU、奥沙利铂(folic acid-5-fluorouracil and oxaliplatin, FOLFOX)化疗方案反应不佳,总体有效率仅有50%左右^[4]。因此,筛选出对FOLFOX化疗方案不敏感的CRC患者,将是提高CRC患者化疗疗效的良好策略,也是CRC精准治疗的重要一环。研究^[5]显示受体相关共激酶3(receptor associated-coactivator 3, RAC3)来源于CRC患者异常扩增的染色体区域20q,并与多种CRC细胞对5-FU及L-OHP的耐药有关。该研究拟通过实验检测RAC3在CRC组织中的表达水平并验证其表达水平与CRC患者对FOLFOX方案敏感度的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 所选48例CRC组织标本来自2016年8月~2017年9月间在安徽医科大学附属安庆医院接受首次CRC根治手术的患者,CRC诊断有明确的病理组织学证据。所有入选患者术前未接受局部或全身的包括化疗、放疗及免疫治疗等在内的任何形式的抗肿瘤治疗。所有标本离体后30 min内进行样本取材并放入液氮贮存,取材范围包括肿瘤组织和相对应的距肿瘤边缘5~10 cm以上的正常黏膜上皮组织。所有入选组织标本具有完整的术后病理资料。同时收集到安徽医科大学第一附属医院及附属安庆医院病理科2014年3月~2017年4月经结肠镜或直肠镜活检并获得病理证实为结/直肠癌125例石蜡包埋组织标本,入选患者初次评估无法手术切除且术前行FOLFOX方案化疗2~3个月,且在化疗后1个月内行影像学检查并根据实体肿瘤客观疗效评定标准进行临床疗效评价,排除术前行新辅助放化疗患者。

2019-01-22 接收

基金项目:安徽省科技计划项目(编号:3101005002598)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普外胃肠一病区,合肥 230022

²安徽医科大学附属安庆医院普外二病区,安庆 246003

作者简介:方昌义 男,主治医师,博士;

余昌俊 男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yuchangjun321@163.com

1.1.2 入选病例一般情况 48 例 CRC 患者中,男 26 例,女 22 例;年龄 40~81 岁,中位年龄 63 岁。术后病理分期按照第七版美国癌症联合委员会联合修订的标准:Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 4 例;病理学类型:高分化 15 例,中分化 19 例,低分化 14 例。125 例石蜡标本中,来源于男性患者 65 例,女性 60 例,年龄 44~75 岁,中位年龄 63 岁,其中远处转移者 76 例(肝脏转移 43 例,其中单发转移灶 31 例,多发转移灶 12 例;骨转移 19 例,其中耻骨联合/髌关节转移 8 例,椎骨及骶前转移 11 例;腹膜后淋巴结及大网膜转移 14 例)、局部病灶浸润固定无法根治性切除者 37 例(前列腺/精囊腺/膀胱/附件侵犯 23 例,髂血管旁淋巴结侵犯 9 例,侧腹壁浸润固定 5 例)。超低位直肠癌(距肛缘 ≤ 3 cm)极力要求保肛者 12 例。

1.1.3 主要试剂及仪器 RNA 提取试剂 RNAiso™ Plus、逆转录试剂及荧光定量试剂盒 SYBR Premix ExTaq II 购自大连 TaKaRa Bio 公司;兔抗人 RAC3 单抗购自美国 Santa Cruz 生物技术公司。酶联免疫检测仪购自美国 Thermo scientific 公司;实时荧光定量 PCR 仪(Light Cycler® 480 System)购自上海罗氏公司;抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒购自上海基因科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 根据逆转录及荧光定量试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。PCR 引物序列见表 1。在 Light Cycler® 480 System 实时荧光定量 PCR 仪上进行两步法 PCR,反应条件见表 2。

表 1 RAC3 实时荧光定量 PCR 引物序列信息

名称	引物序列(5'-3')
RAC3	F: AAGTGAAGAGGGATCTGGA
	R: CAGATGACTACCATTTGAGG
β -actin	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG
	R: AGCACTGTGTTGCCGTACAG

表 2 CRC 组织标本 RAC3 实时荧光定量 PCR 反应参数

步骤	条件
预变性	95 °C 30 s (升温速率:4.4 °C/s)
PCR	1 循环
	分析模式: 定量分析
	95 °C 5 s (升温速率:4.4 °C/s)
融解	60 °C 30 s (升温速率:2.2 °C/s) 获取模式: 单一
	40 循环
	分析模式: 融解曲线
	95 °C 5 s (升温速率:4.4 °C/s)
	60 °C 1 min (升温速率:2.2 °C/s)
	95 °C (升温速率:0.11 °C/s; 获取模式: 连续 5 °C) 1 循环

1.2.2 免疫组化 免疫组化石蜡切片经脱蜡水化、高压抗原修复后按照说明书进行免疫组化染色。显微镜下检测组织切片中 RAC3 的蛋白表达情况。对染色强度进行评分:0 分(未染色)、1 分(淡黄色弱染色)、2 分(棕黄色中度染色)、3 分(棕褐色强染色)。对染色面积进行打分:0 分(<10%)、1 分(10%~25%)、2 分(25%~50%)、3 分(50%~75%)、4 分(>75%)。染色总得分 = 染色强度得分 $\times$ 染色面积得分。染色总得分 ≤ 3 分定义为阴性,3 分<总得分 ≤ 6 分为弱阳性,>6 分为强阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,student's t 检验用于比较 CRC 组织与癌旁正常组织中的 RAC3 表达水平差异, χ^2 检验用于比较 CRC 组织中 RAC3 的相对表达水平与术后临床病理指标之间的关系。Kaplan-Meier 生存分析及 Log-rank 检验用于比较不同 RAC3 表达水平患者的预后差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 组织中 RAC3 的表达水平及其与临床病理特征之间的关系 qRT-PCR 结果显示 CRC 组织中 RAC3 水平明显高于癌旁正常黏膜上皮组织(数据以 ΔCt 显示, $P < 0.01$),见图 1。并且分析结果显示 RAC3 表达水平与肿瘤较晚分期($P = 0.041$)、微血管侵犯($P = 0.014$)、淋巴结转移($P = 0.030$)相关,见表 3,提示 RAC3 可能与 CRC 患者预后有关。随后分析癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)公共数据库中 597 例 CRC(低表达组患者 298 例,高表达组患者 299 例)患者的总生存数据,Kaplan-Meier 生存分析显示 RAC3 表达增高的 CRC 患者术后总体生存期(overall survival, OS)缩短($P < 0.01$),见图 2。

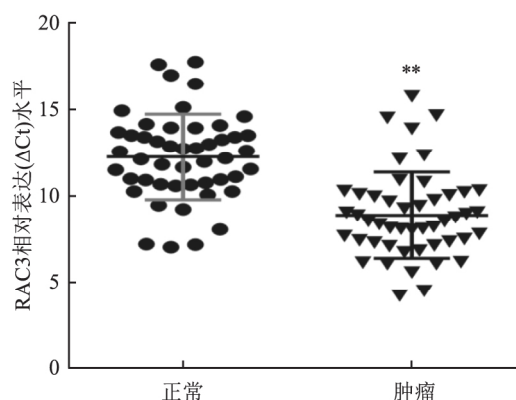


图 1 RAC3 在结肠癌组织及癌旁正常结肠黏膜组织中表达水平与正常结肠黏膜比较: ** $P < 0.01$

表3 CRC 组织中 RAC3 的表达水平与不同临床病理特征之间的关系

临床病理特征参数	例数 (n=48)	RAC3 相对表达水平		χ^2 值	P 值
		低	高		
年龄(岁)				1.255	0.263
≤65	19	8	11		
>65	29	17	12		
性别				2.172	0.141
男	26	11	15		
女	22	14	8		
肿瘤最大直径(cm)				0.349	0.555
≤3	25	12	13		
>3	23	13	10		
TNM 分期				4.174	0.041
I + II	32	20	12		
III + IV	16	5	11		
组织分化				0.674	0.412
良好 + 中等	34	19	15		
差	14	6	8		
微血管侵犯				6.011	0.014
是	13	3	10		
否	35	22	13		
淋巴结转移				4.703	0.030
阳性	12	3	9		
阴性	36	22	14		

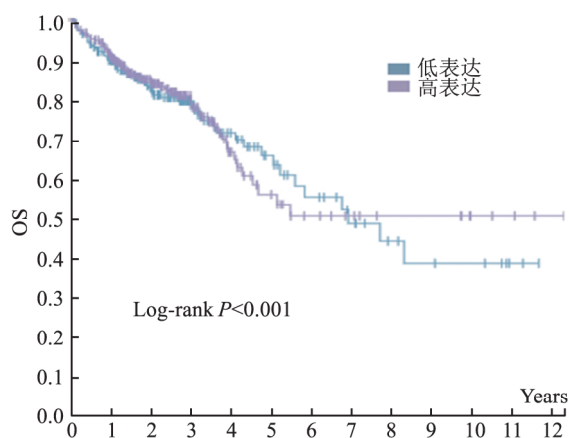


图2 Kaplan-Meier 生存曲线显示 TCGA 数据库中不同 RAC3 表达水平的 CRC 患者的 OS

2.2 CRC 组织中 RAC3 的蛋白表达水平及其与 FOLFOX 化疗方案临床疗效之间的关系 RAC3 抗体免疫组化染色后,阳性信号(棕褐色颗粒),主要在细胞质中表达。结果显示 CRC 组织中 RAC3 高表达,正常结肠黏膜上皮组织 RAC3 不表达或弱表达,见图3。随后根据 RAC3 蛋白在 CRC 组织中的表达水平分为阴性和阳性两组,并分析其与患者对 FOLFOX 化疗方案敏感性之间的关系。结果显示 RAC3 阳性表达患者对 FOLFOX 化疗反应较差 ($P < 0.05$)。见表4。

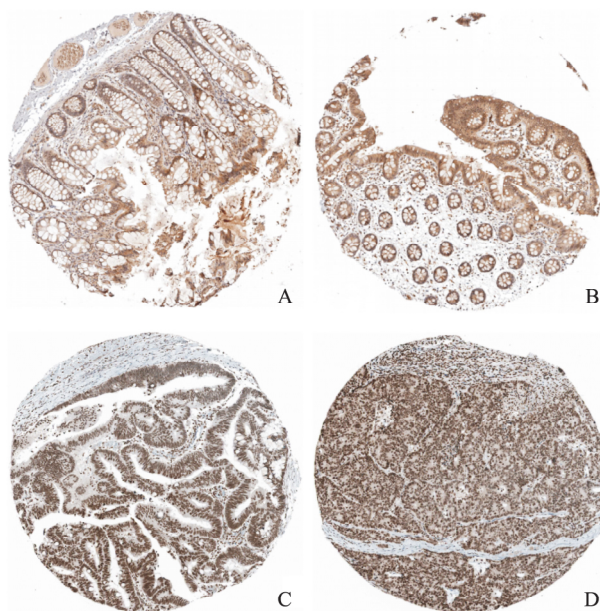
图3 免疫组化分析 RAC3 在正常结肠黏膜上皮和结肠癌组织中的表达水平
A、B: 正常结肠黏膜上皮; C、D: 结肠癌组织

表4 不同 RAC3 表达水平对 FOLFOX 化疗反应的比较[n(%)]

项目	n	CR	PR	SD	PD	CR + PR
阳性	71	5(7.04)	26(36.62)	29(40.85)	11(15.49)	31(43.66)
阴性	54	7(12.96)	30(55.56)	14(25.92)	3(5.56)	37(68.52)
χ^2 值						7.639
P 值						<0.05

CR: 完全缓解; PR: 部分缓解; SD: 疾病稳定; PD: 疾病进展

3 讨论

CRC 已成为我国居民健康的严重威胁和医疗卫生的重大负担。虽然 CRC 的综合诊疗逐渐规范、临床疗效提高,但 CRC 患者的总体预后仍较差,五年标准化生存低于欧美等发达国家 10 个百分点左右^[6]。自 20 世纪 90 年代开始,辅助化疗进入临床实践,代表性药物如 5-FU 等能在一定程度上改善 CRC 患者的总体预后,由此进入了根治性手术与辅助化疗相结合的综合治疗的年代。但化疗耐药事件在临床上时有发生,部分患者对化疗反应不敏感,最终导致肿瘤复发或转移,严重影响预后。CRC 化疗耐药的出现,与多种潜在的关键调控分子及信号通路的激活有关。因此,针对驱动化疗耐药的关键基因开展研究,将是加快化疗耐药基础及临床研究进展、提高 CRC 患者化疗疗效的良好策略,也是 CRC 综合治疗精准化和个体化的重要内涵。

RAC3 来源于 CRC 患者异常扩增的染色体区域 20q,同时也是影响包括乳腺癌在内的多种肿瘤患者

预后的重要因素^[7-8]。在中国人群中,约35%的CRC样本出现RAC3过表达且影响肿瘤的进程^[9]。新近研究显示结肠癌中RAC3过表达与包括HCT116在内的多种CRC细胞对5-FU及L-OHP的耐药有关^[5],其可能的机制涉及抗自噬作用以及核因子 κ -B(nuclear factor κ -B, NF- κ B)分子的激活等^[10]。由此,RAC3可能是筛选对FOLFOX化疗反应不敏感的CRC患者亚群的潜在标志物^[11]。

本研究显示,RAC3在CRC组织中的表达明显高于癌旁正常结肠黏膜上皮组织,免疫组化结果亦显示RAC3蛋白阳性表达率在CRC组织中较高,差异有统计学意义。通过分析CRC组织标本的临床病理资料表明,RAC3的表达水平在有淋巴结转移及较晚临床分期患者中较高,与Xie et al^[12]等研究结果相一致。同时本研究还表明有微血管侵犯的CRC组织标本中RAC3水平亦显著增高,这些结果表明RAC3过表达与CRC的进程相关,可能影响患者预后。TCGA公共数据库中597例CRC患者的Kaplan-Meier生存分析显示RAC3表达增高的CRC患者术后5年生存率为56%,而RAC3低表达的患者术后5年生存率为64%。随后依据RAC3蛋白是否表达对经肠镜活检CRC标本进行分组,并分析亚组患者对FOLFOX方案化疗的敏感度。结果显示RAC3阳性表达组患者的CR+PR率只有43.66%(31/71),明显低于RAC3阴性表达组患者68.52%(37/54),差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明RAC3在CRC组织中高表达与患者恶性病理特征有关,提示患者预后不良;该患者亚群对FOLFOX化疗方案的敏感度较低,可能需要包括多学科协作在内的更加精准的个体化综合治疗以及更加精细的术后管理和监测。

综上所述,本研究揭示RAC3可能参与CRC的发展进程,并与患者对FOLFOX化疗方案的临床反应有关。RAC3可能是CRC精准治疗策略中一个潜在的生物标志物。

参考文献

- [1] Fang J Y, Shi Y Q, Chen Y X, et al. Chinese consensus on prevention of colorectal cancer (2016, Shanghai) [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(2): 63-83.
- [2] Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 42(3): 317-25.
- [3] Rabik C A, Dolan M E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents [J]. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(1): 9-23.
- [4] Saltz L B, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study [J]. *J Clin Oncol* 2008, 26(12): 2013-9.
- [5] Rubio M F, Lira M C, Rosa F D, et al. RAC3 influences the chemoresistance of colon cancer cells through autophagy and apoptosis inhibition [J]. *Cancer Cell Int* 2017, 17: 111.
- [6] Allemani C, Weir H K, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676, 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. *Lancet* 2015, 385(9972): 977-1010.
- [7] He L R, Liu M Z, Li B K, et al. Over-expression of AIB1 predicts resistance to chemoradiotherapy and poor prognosis in patients with primary esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(9): 1591-6.
- [8] Burandt E, Jens G, Holst F, et al. Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat* 2013, 137(3): 745-53.
- [9] Li Z, Fang Z Y, Ding Y, et al. Amplifications of NCOA3 gene in colorectal cancers in a Chinese population [J]. *World J Gastroenterol* 2012, 18(8): 855-60.
- [10] Fernandez Larrosa P N, Alvarado C V, Rubio M F, et al. Nuclear receptor coactivator RAC3 inhibits autophagy [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(12): 2064-71.
- [11] Tsuji S, Midorikawa Y, Takahashi T, et al. Potential responders to FOLFOX therapy for colorectal cancer by Random Forests analysis [J]. *Br J Cancer* 2012, 106(1): 126-32.
- [12] Xie D, Sham J S, Zeng W F, et al. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma [J]. *Hum Pathol* 2005, 36(7): 777-83.

Expression of RAC3 in colorectal cancer and its efficacy in FOLFOX chemotherapeutic response

Fang Changyi¹, Zan Jianbao², Miao Xiang², et al

(¹Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of General Surgery, Anqing Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anqing 246003)

Abstract Objective To investigate the expression and its efficacy in predicting FOLFOX chemosensitivity of

网络出版时间: 2019-5-9 10:21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.032.html>

严重少弱精子症 ICSI 失败后 改行供精人工授精的妊娠结局分析

李君^{1,2,3} 李彩华^{1,2,3} 郭培培^{1,2,3} 王影^{1,2,3} 魏兆莲^{1,2,3}

摘要 目的 分析严重少弱精子症患者卵泡浆内单精子注射(ICSI)失败后改行供精人工授精(AID)的临床妊娠率(CPR)。方法 回顾性分析因男方严重少弱精子症行ICSI助孕失败后改行AID助孕共114周期为研究组,同期选取因男方无精子症直接行AID助孕的416周期为对照组,比较两组妊娠结局并探究其影响因素。结果 研究组的每周期CPR低于对照组(12.3% vs 24.8%),差异有统计学意义($P < 0.05$);研究组中的双次授精及促排卵周期每周期CPR均高于单次授精及自然周期治疗,差异有统计学意义($P < 0.05$);体质指数(BMI)、不孕类型对CPR均无影响,差异无统计学意义。结论 男方严重少弱精子症行ICSI助孕失败后改行AID助孕的每周期CPR低于对照组,促排卵能提高CPR。

关键词 卵泡浆内单精子注射; 供精人工授精; 临床妊娠率
中图分类号 R 711.6

2019-01-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1708085MH214)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 合肥 230022

²安徽医科大学生殖健康与遗传安徽省重点实验室, 合肥 230022

³安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 李君, 男, 硕士研究生;

魏兆莲, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: weizhaolian_1@126.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0809-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.032

近年来不孕不育的人数呈增长趋势。文献^[1]表明, 在生育年龄的人群中有10%~15%患有不孕或不育, 这其中男性不育者占比近40%, 10%~20%不育因素为严重少弱、畸精子症或无精子症。随着卵泡浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术的出现, 为严重少弱、畸精子症患者提供了一个新的助孕方式, 相对于常规体外受精, ICSI极大程度上降低了对精子数量、活力及形态的要求, 但是一部分患者经过ICSI仍然失败, 此时可以选择供精人工授精(artificial insemination with donor semen, AID)助孕。而目前对此类患者选择AID助孕的妊娠结局关注甚少。该研究通过分析此类患者AID助孕的妊娠结局探究其相关影响因素。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2011年1月~2017年10月在安徽医科大学第一附属医院生殖中心因严重少弱精子症行ICSI助孕取卵2周期(每周期取卵 ≥ 5 枚)移植后均未孕, 患者要求改行AID助孕, 且经过本中心伦理委员会批准的共114个周期为研究组。对照组选取同期因男方非梗阻性无精子症行

receptor associated-coactivator 3 (RAC3) in colorectal cancer(CRC). **Methods** Forty-eight paired clinical samples and clinicopathologic characteristics were analyzed. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis was used to evaluate expression levels of RAC3 in colorectal cancer tissues. Immunohistochemical method was used to explore the expression of RAC3 protein in 125 cases of exploratory biopsies. **Results** RAC3 was up-regulated in CRC tissues compared with adjacent mucosa ($P < 0.01$), and its expression level was significantly correlated with TNM stage, vascular invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier plot in TCGA database showed that the median survival period in the CRC patients with high RAC3 expression level was shorter than the low expression subgroup. Positive expression of RAC3 protein CRC patients had lower sensitivity to FOLFOX regimen than negative expression of RAC3 protein (Folic acid-5-fluorouracil and oxaliplatin). **Conclusion** RAC3 is up-regulated in CRC tissues and its expression level is significantly correlated with unfavorable prognosis. In addition, RAC3 possesses the potential to be a predictive marker for CRC prognosis and chemotherapeutic response.

Key words receptor associated-coactivator 3; colorectal cancer; chemosensitivity